

Erfðamengisbreytingar í ættlægum B-eitilfrumumeinum



**Lóa Björk
Óskarsdóttir**

Höfundur er
lífeindafræðingur MSc.
lbo8@hi.is

*Greinin er byggð á
bluta ritgerðar til
meistaraprófs í líf- og
læknávisindum og var
lögð fram til varnar
við læknadeild HÍ
í maí 2012.*

*Leiðbeinendur og
meðhöfundar:*

**Helga M.
Ögmundsdóttir**,
prófessor við
læknadeild HÍ.
helgaogm@hi.is

Hlíf Steingrimsdóttir,
yfirleknir á
blóðlækningadeild
Landspítalans.
hlifst@landspitali.is

Lýkilorð:
B-eitilfrumur,
samanburðargreining
erfðamengja á
örflögu (array-CGH),
gen ónæmisglóbúlína,
macróglóbúlínemía.

Ágrip

Inngangur: Einstofna mótefnahækkun (*Monoclonal Gammopathy*, MG) orsakast af afbrigðilegri fjölgun og þroskun eins stofns af B-eitilfrumum sem framleiða einstofna ónæmisglóbúlín. Mótefnahækkun án einkenna illkynja sjúkdóms (*Monoclonal Gammopathy of Unknown Significance*, MGUS) getur þróast í illkynja mergæxli (*Multiple Myeloma*, MM). Waldenström's macróglóbúlínemía er illkynja B-eitilfrumusjúkdómur sem þróast út frá forstigs B-eitilfrumu. Lýst hefur verið ættlægri tilhneigingu til MG í yfir 130 fjölskyldum um allan heim.

Ofursvarandi B-eitilfrumur hafa fundist í 12 heilbrigðum nánnum ættingjum sjúklinga með MM eða MGUS. B-eitilfrumurnar framleidda marktækt meira ónæmisglóbúlín en B-eitilfrumur viðmiða eftir mítógenörvun *in vitro*. Þær lifðu einnig lengur í *Poke-weed* rækt en frumur viðmiða.

Markmið: Tilgangur verkefnisins var að framkvæma víðtæka samanburðargreiningu erfðamengja á örflögu (array-CGH) þar sem skimað yrði fyrir genamengisbreytingum í B-eitilfrumum ofursvara og bera saman við skyld og óskyld heilbrigð viðmið.

Efni og aðferðir: Array-CGH var gert á einangruðu DNA úr B-eitilfrumum og borið saman við DNA kornfrumna (granúlócyta) úr hverjum einstaklingi. Notaðar voru 12 sýna örflögur með 135.000 þreifurum sem dreifast um allt erfðamengi mannsins.

Niðurstöður: Samanburðargreining á örflögu sýndi breytingar á svæðum ónæmisglóbúlína eins og við var að búast. Viðbætur og úrfellingar í B-eitilfrumum miðað við kornfrumur sáust dreift um allt erfðamengið. Marktækt færri viðbætur voru í ofursvörum miðað við viðmið á 8 litningum.

Sá breytileiki sem greinist með samanburðargreiningu er að öllum líkindum tengdur erfðafnisbreytingum vegna sækniþroskunar og flokkaskipta. Minni almennur breytileiki hjá ofursvörum getur mögulega verið tilkomin vegna þess að B-eitilfrumur ofursvara taki í minni mæli út þroska í kímstöð en eðlilegt er og hafi því minni tíma til punktstökkbreytinga.

Inngangur

Fjöldabreytingar á DNA bútum

Þekkt er að breytileiki í erfðamenginu til dæmis úrfelling eða viðbót á DNA bútum í ákveðnum genum getur haft áhrif á virkni gena og þar með þróun eða tilvist sjúkdóma eða fötlunar [1,2]. Hefðbundin litningagreining er nothæf við að finna stóra búta sem eru tapaðir eða aukreitir í erfðamenginu en til þess að finna fjöldabreytingar á minni DNA bútum hentar samanburðargreining erfðamengja (*comparative genome hybridization*, CGH) vel.

Hefðbundið miðfasa CGH finnur og skráir fjöldabreytingar DNA raða í erfðamenginu. Þá er próf-DNA og viðmiðunar-DNA flúrlitað með sitthvorum litnum og þessi lituðu erfðafni þáttapöruð við eðlilega mannalitninga

í miðfasa og þá keppa lituðu erfðafnin um bindingu við litningana. Eftir bindingu er hlutfall prófs- og viðmiðunar-DNA metið á hverjum litningi. Ef jafnt er af próf- og viðmiðunar-DNA er hlutfallið einn. Tapaður bútur fær hlutfall undir einum en viðbót í erfðafninu fær yfir einum. Með þessari hefðbundnu CGH aðferð er hægt að greina fjöldabreytingar stærri en 5-10 Mbasar. Smærri breytingar sjást ekki [3].

Samanburðargreining erfðamengja á örflögu

Sú aðferð sem gefur besta mynd af öllu erfðamenginu er örflögu-CGH. Þessar örflögur eru með allt erfðamengi mannsins bundið á sýnasvæði flögunnar, því er dreift í bútum um svæðið. Prófið gengur út á samanburð á próf-

erfðæfni við annað erfðæfni eins og hefðbundið CGH. Erfðæfni er einangrað úr hvoru sýni fyrir sig, merkt með sitt hvorum flúrskinslitnum og parað saman. Áður en parað sýnið er sett á flögu þarf að hita sýnið svo DNA þræðirnir aðskiljast og geta þá bundist einþátta erfðamenginu á flögunni. Eftir bindingu er allt óbundið þvegið burtu og flagan skönnuð. Gögnin sem koma út eftir skönnun er hægt að skoða á log2 skala en fyrst þarf að fjarlægja áhrif af umhverfisþáttum, svo sem mögulegan breytileika á niðurstöðum milli flaga sem verður vegna smíði eða geymslu þeirra. Þá eru gögnin hlutuð niður í samfelld svæði (*segment*) sem sýna sömu hegðun í samanburði milli sýnanna og ákveða þarf hve mikið frá meðaltalinu hver bútur þarf að vera til þess að teljast úrfelling eða viðbót í erfðamenginu. Þá er hægt að teikna upp gögnin og sjá hlutfall próf-erfðæfnisins miðað við viðmiðunar erfðæfni [4].

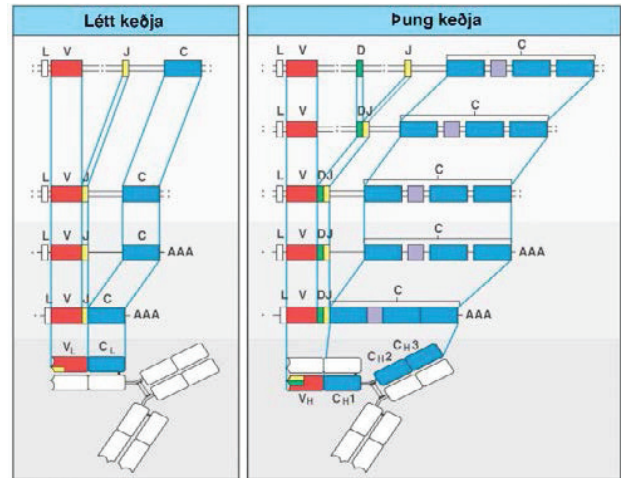
B-eitilfrumur og framleiðsla ónæmisglóbúlína

B-eitilfrumur eru nauðsynlegur hluti sérhæfða ónæmiskerfisins. B-eitilfrumur skynja utanaðkomandi vaka sem eru til dæmis á yfirborði baktería eða veira með vakaviðtökum. Þessir vakaviðtakar geta bæði verið himnubundnir (B-frumu viðtakar) eða vessabundin mótefni (ónæmisglóbúlín, Immúnóglóbúlín, Ig) sem plasmafrumur seyta frá sér.

Hvert mótefni, öðru nafni Ig hefur tvær þungar keðjur (~50 kDa) og tvær léttar keðjur (25 kDa). Til eru fimm gerðir þungra keðja: μ – δ – γ – α – ϵ og heita ónæmisglóbúlínin eftir þeim, það er: IgM, IgD, IgG, IgA og IgE. Í hverju ónæmisglóbúlíni eru þungu keðjurnar af sömu tegund og þær léttu af sömu tegund og hafa því tvo eins vakaviðtaka. Til eru tvær tegundir létttra keðja, þær eru kappa (κ) og lambda (λ). Enginn munur er á ónæmisglóbúlínum hvort sem þau hafa kappa eða lambda keðjur. Bæði þungu og léttu keðjur ónæmisglóbúlína innihalda breytileg svæði (*variable, V-region*) og föst svæði (*constant, C-region*). Breytilega svæðið er vakaviðtakinn sjálfur og er mest breytilegt á þremur svæðum en milli þeirra eru fjögur minna breytileg svæði. Þegar þungar og léttar keðjur parast fara mest breytilegu svæðin saman og mynda eitt svæði, vakabindiset [5].

Gen þungu keðju ónæmisglóbúlína eru í bútum á litningi 14 og gen léttu keðju ónæmisglóbúlína eru einnig í bútum. Bútar kappa keðju eru á litningi tvö en genabútar lambda keðju eru á litningi 22.

Genin fyrir breytilega svæðið eru einnig í bútum. Við þroskun eitilfrumna í beinmerg verður umröðun á þessum bútum til þess að mynda breytilega svæðið. Hver genabútur er til í mörgum ólíkum afritum í erfðamenginu og er tilviljun hver þeirra er valinn. Genabútar fyrir breytilega og fasta svæðið eru á mismunandi stöðum á viðkomandi litningi. En eftir umröðun og þroskun B-eitilfrumna eru þessi svæði nær hvert öðru, sjá mynd 1. Af þessu sést að mikið er um breytileika á þessum svæðum erfðamengisins og vegna mikils fjölda genabúta sem ekki taka þátt í umröðun og myndun ónæmisglóbúlína hverju sinni er tap sjáanlegt á þessum svæðum með CGH rannsóknum á B-eitilfrumum, sjá síðar. Þannig er hægt að sjá að



A

B

Mynd 1: Umröðun genabúta í ónæmisglóbúlínum.

Genabútar á viðkomandi litningum raðast saman og mynda starfþæft ónæmisglóbúlín.

Mynd A sýnir umröðun genabúta fyrir léttu keðju ónæmisglóbúlína. Genabútar eru á litningum 2 og 22. V (*variable*) er breytilegt svæði, J (*joining*) er tengisvæði og C (*constant*) er fasta svæðið.

Mynd B sýnir á sama hátt umröðun genabúta fyrir þungu keðju ónæmisglóbúlína, þeir genabútar eru á litningi 14. Til viðbótar þar er D (*diversity*), fjölbreytt svæði og stærra fast svæði. Mynd byggð á Murphy et al., 2008 [5].

þessi umröðun á sér stað í B-eitilfrumum en ekki öðrum frumum líkamans [5,6].

Þegar IgM er tjáð á yfirborði B-eitilfrumna fer fram neikvætt val og þær frumur sem lifa af neikvætt val yfirgefa beinmerg og fara í milta. Þar fer fram annar umgangur af neikvæðu vali áður en þær verða fullþroskaðar. Litill hluti B-eitilfrumna í milta verður eftir sem óreyndar (*naive*) marginal zone B-eitilfrumur. Flestar halda þó áfram för sinni og hringsóla milli milta, eitla og beinmergs þar til þær annað hvort deyja eða bindast utanaðkomandi vökum. Þegar þær tengjast utanaðkomandi vaka fer fram hröð frumufjölgun, punkstökkbreytingar (*somatic hypermutation, SHM*) og flokkaskipti úr IgM í einn af hinum flokkunum, IgA, IgE eða IgG. Þetta á sér stað í kímstöð og að lokum fara frurnar úr kímstöð og þroskast þar sem mótefnaseytandi plasmafrumur eða langlífir minnisfrumur [7]. Þroskun getur einnig í litlum mæli átt sér stað utan kímstöðvar [8].

Kímstöð er helsti staður þar sem SHM í genum breytilegra svæða ónæmisglóbúlína eiga sér stað. Með þessum stökkbreytingum myndast ónæmisglóbúlín með háa sækni í þann utanaðkomandi vaka sem B-eitilfruma hefur áður bundist. Þessar stökkbreytingar eru grundvöllur sækniþroskunar við vakasérhæft ónæmisviðbragð [9]. Allar B-eitilfrumur í blóði hafa gengið í gegnum alla þroskun í merg en bara hluti þeirra hefur gengið í gegnum sækniþroskun og flokkaskipti. Þannig eru B-eitilfrumur í blóði blandaður hópur af þroskuðum eitilfrumum úr merg ásamt langlífum minnisfrumum og plasmafrumum eftir þroskun þeirra í kímstöð.

Einstofna mótefnahækkun

Einstofna mótefnahækkun (*Monoclonal Gammopathy*, MG) orsakast af afbrigðilegri fjölgun og þroskun eins stofns af B-eitilfrumum sem framleiða einstofna ónæmisglóbúlín sem mælast í blóðvökva og/eda þvagi. Þessi ónæmisglóbúlín kallast einnig M-prótein og geta verið af IgM, IgG eða IgA gerð og IgE gerð en hún er mjög sjaldgæf [10]. Einstofna mótefnahækkun án einkenna illkynja sjúkdóms (*Monoclonal Gammopathy of Unknown Significance*, MGUS) er eitt algengasta forstíga illkynja sjúkdóms í fólki eldra en 50 ára í heiminum. *Smoldering Multiple Myeloma* (SMM) er millistig við þróun MGUS í illkynja mergæxli (*Multiple Myeloma*, MM) [11]. Waldenström's macróglóbúlínemía (WM) er illkynja B-eitilfrumusjúkdómur sem þróast út frá forstíga B-eitilfrumu áður en hún fer í gegnum kímstöð og hefur ekki gengið í gegnum flokkaskipti [12].

Um 130 fjölskyldum hefur verið lýst um allan heim þar sem tveir eða fleiri einstaklingar innan fjölskyldunnar eru greindir með MGUS, MM eða WM. Í íslenskri rannsókn kom fram að fyrsta stíga ættingjar MM sjúklinga eru í meira en tvöföldri áhættu á að fá sjúkdóminn [13] og í stórrí samskipt rannsókn var sýnt fram á að fyrsta stíga ættingjar MGUS einstaklinga eru í þrefaldri hættu á að greinast með MGUS eða MM og tvöföldri hættu á að greinast með WM [14].

Hér á landi er tíðni MG 10,3/100.000 karla og 8,6/100.000 kvenna. Af þeim sem fundust með MG höfðu 29% illkynja sjúkdóm en 71% MGUS. Líkurnar á að MGUS þróist yfir í illkynja eitilfrumusjúkdóm er 1-1,5% á ári og hækkar með aldri [15] og hækkar einnig með auknum styrk M-próteins í blóðvatni [10].

Einstaklingar með ofursvarandi B-eitilfrumur í íslenskum fjölskyldum með ættlæg B-eitilfrumumein

Á Íslandi hafa fundist 8 fjölskyldur með háa tíðni MG. Hjá 12 heilbrigðum einstaklingum í fjórum þessara fjölskyldna, nánum ættingjum sjúklinga með MM eða MGUS, hafa fundist ofursvarandi B-eitilfrumur. Í öllum fjórum fjölskyldunum hafa bæði greinst tilfelli mergæxla og IgM-MGUS og í tveimur þeirra WM [16]. Í þeim rannsóknum voru einkjarna frumur úr blóði ræktaðar með *poke-weed* mítogeni og styrkur IgM og IgG mældur í flötum ræktanna. Ef styrkur ónæmisglóbúlína í fjölskyldumeðlimum fór meira en tvö staðalfrávik yfir styrk ónæmisglóbúlína viðmiðs á degi 7 í rækt voru viðkomandi B-eitilfrumur skilgreindar sem ofursvarandi [17]. Ofursvarandi B-eitilfrumurnar lifðu einnig lengur í *Poke-weed* rækt heldur en frumur viðmiðs og tengdist það framfengdri tjáningu á dauðavarnarpróteininu Bcl-2 [18].

Markmið

Að framkvæma víðtæka samanagerðgreiningu erfðamengja á örflögu (*array*-CGH) þar sem skimað yrði fyrir genamengisbreytingum í B-eitilfrumum einstaklinga sem höfðu verið skilgreindir með ofursvarandi B-eitilfrumur og bera saman við skyld og óskyld heilbrigð viðmið af sama kyni á svipuðum aldri.

Efni og aðferðir

Sýni

Leitað var til fólks úr fjórum af fjölskyldunum átta og samþykktu 11 ofursvarar og 11 viðmið úr sömu fjölskyldum að taka þátt í þessari rannsókn. Fyrir hvern ofursvara var fengið óskýlt viðmið og voru viðmið af sama kyni og á svipuðum aldri. Fengin voru leyfi hjá Persónuvernd, Vísindasiðanefnd og upplýst samþykki var fengið frá hverjum þátttakanda. Hver þátttakandi gaf um 70 ml blóðs sem tekið var í EDTA blóðtökgulö (Vacutainer®, BD, NJ, BNA).

Einangrun frumna

Einkjarna blóðfrumur voru einangraðar með Histo-paque®-1077 (Sigma, MO, BNA) þéttnistigli. CD19+ B-eitilfrumur voru síðan einangraðar með CD-19 MACS einangrunarsetti (Miltenyi Biotec, Þýskaland).

B-eitilfrumur voru frýstar fyrir DNA einangrun sama dag og frumueinangrun var gerð (Meistaraverkefni Sóleyjar Valgeirsdóttur, 2011).

Rauðkornaþykki sem einnig innihélt kornfrumur (*granulocytes*), neðst á botninum eftir Histo-paque®-1077 einangrun, var safnað í tvö tveggja ml frystiglös og fryst í -80°C. Úr því var gerð DNA einangrun á kornfrumum til þess að nota sem viðmið með hverju B-eitilfrumusýni við örflögu-CGH rannsókn.

DNA einangrun úr B-eitilfrumum og kornfrumum: DNA var einangrað úr frystum B-eitilfrumum og kornfrumum með QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Þýskaland). Farið var eftir leiðbeiningum sem fylgja einangrunarsettinu.

Gæði og magn einangraðs DNA var metið með því að setja það í NanoDrop® (Thermo) mæli og rafdraga á 1% agarósageli. Í NanoDrop sást magn DNA (ng/μl), hlutfall DNA/prótein sem átti að vera um eða yfir 1,8 og hlutfall DNA/lífræn efni sem átti að vera um eða yfir 1,9. Þynn-ingarhlutfall DNA í AE buffer mátti vera á bilinu 250-1000 ng/μl og þurfti að þurrka flesti sýni með Savant Speed-Vac® DNA100 þétti (*Concentrator*) til þess að ná því hlutfalli áður en hægt væri að flúrmerkja þau fyrir CGH.

Flúrmerking á DNA fyrir CGH

Flúrmerking sýna fyrir örflögu-CGH var gerð á DNA úr B-eitilfrumum og kornfrumum úr hverjum þátttakanda samkvæmt leiðbeiningum frá Roche-NimbleGen. Hálf μg af DNA úr B-eitilfrumum var sett út í 40 μl af cy3 (nú kirna vísar merktir með flúrlit sýnilegum við 570 nm og bindast um allt erfðamengið) og rúmmálið fyllt upp að 80 μl með hreinsuðu vatni í 0,2 ml glösum. Á sama hátt var DNA úr kornfrumum sett út í 40 μl af cy5 (nú kirna vísar merktir með flúrlit sýnilegum við 670 nm og bindast um allt erfðamengið). Blöndurnar voru hitaðar í 98°C til þess að aðgreina DNA þræðina og síðan snöggkældar á ísvatni svo að erfðaeftirbúið héldist aðskilið. Þá var 20 μl af dNTP (kirni/núkleótíð/Klenow-kjarnsýruútkljúfur/exonuclease) blöndu bætt út í, blandan sett í þáttapörunartæki í 3 klst. við 37°C til þess að binda flúrmerkta vísana við einþátta DNA og lengja þá með kirnum. Hvarfið var stöðvað með

10 µl af 0,5 M EDTA stopp lausn. Eftir hreinsun með alkóhóli var botnfallið þurrkað í *speed vac* og 25 µl af hreinu vatni bætt út í botnfallið. Botnfallið leyst vel upp í vatninu og magn- og gæðamælt á Nanodrop. Þá var 20 µg af merktu DNA úr B-frumum og 20 µg af merktu DNA úr kornfrumum sama þáttakanda sett saman í glas og þurrkað í *speed vac* á lágum hita í myrkri. Nú voru pörðu sýni geymd í -20°C þar til þau voru sett á flögu.

Örflögugreining á CGH

Í samráði við sérfræðinga hjá Roche-NimbleGen á Íslandi var ákveðið að nota 12x135K flögu frá þeim. Á hverri flögu er pláss fyrir 12 sýni þar sem 135.000 þreifarar geta bundist hverju sýni. Farið var eftir stöðluðum aðferðum hjá Roche-NimbleGen við að hlaða sýnum á flögurnar og var það gert á rannsóknarstofu hjá þeim undir þeirra

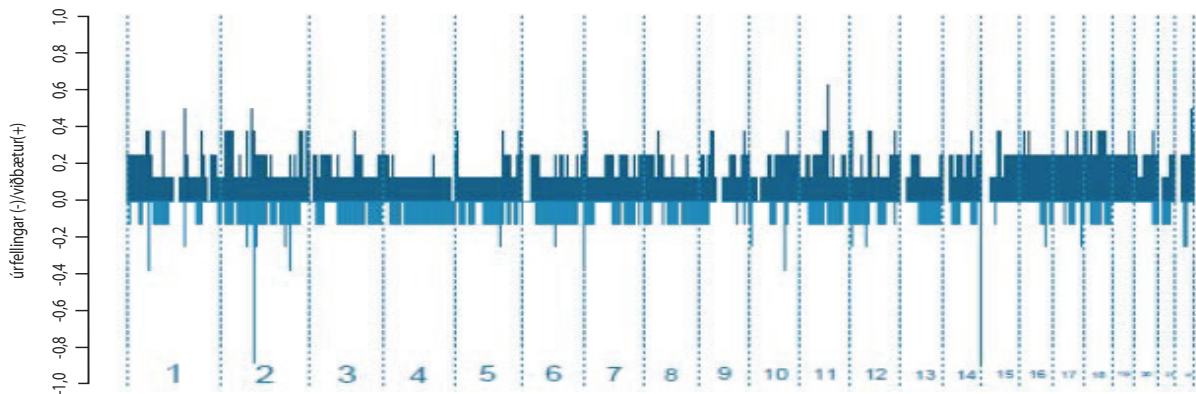
handleiðslu og öll aðföng fengin þar. Tveggja lita örflögur voru skannaðar í NimbleGen í MS 200 örflögu skanna og MS 200 hugbúnaður var notaður við að safna gögnum af flögurni á geisladisk.

Tölfræðiúrvinnsla

Við úrvinnslu á CGH gögnum var notast við WaviCGH forrit á alnetinu (<http://wavi.bioinfo.cnio.es/> sótt 15.júní 2011). Forritið er samansafn R-forrita úr bioconductor pakkasafni [19,20].

Hlutfall cy3 og cy5 flúrmerkja var lesið sem log2 hlutfall. Til þess að fjarlægja áhrif af umhverfisþáttum var gerð normalisering þar sem vegið miðgildi var dregið frá log2 hlutföllum fyrir hverja flögu. Til þess að brjóta erfðæfnið upp í samfelld svæði sem sýndu sömu hegðun í samanburði milli sýnanna (*segmentation*) var notaður DNACopy

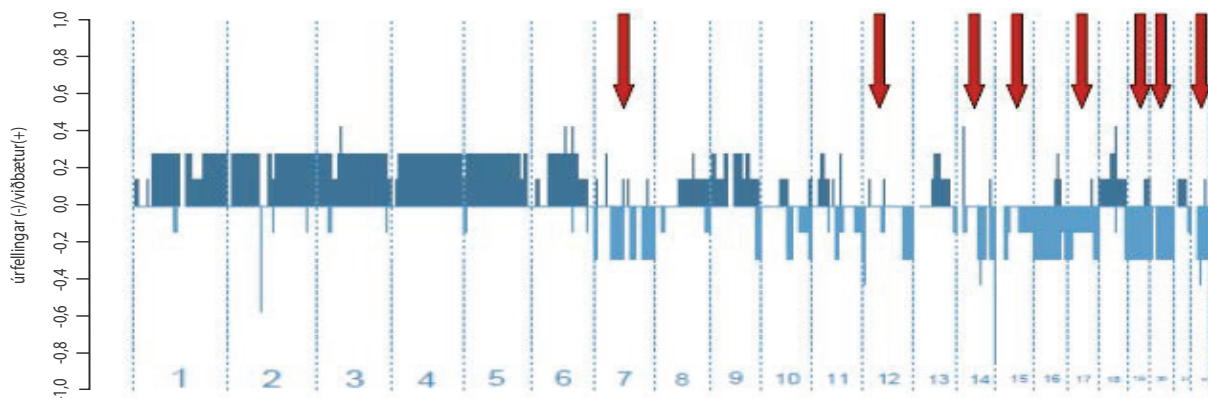
Allir litningar - óskyldir (n=8)



Mynd 2. Samanburður erfðamengja á örflögu hjá óskyldum viðmiðum.

Myndin sýnir viðbætur (dökkblár litur) og úrfellingar (ljósblár litur) á erfðamengi óskyldra viðmiða. Hæð bverrar súlu táknar fjölda óskyldra viðmiða sem hafa viðbót/úrfellingu á viðkomandi svæði. Erfðamenginu er skipt upp í litninga nr. 1-22 (X-ás), kynlitningum var sleppt við úrvinnslu.

Allir litningar - ofursvarar (n=7)



Mynd 3. Samanburður erfðamengja á örflögu hjá ofursvörum. Myndin sýnir viðbætur (dökkblár litur) og úrfellingar (ljósblár litur) á erfðamengi ofursvaranna. Hæð bverrar súlu táknar fjölda ofursvara sem hafa viðbót/úrfellingu á viðkomandi svæði. Erfðamenginu er skipt upp í litninga nr. 1-22 (X-ás), kynlitningum var sleppt við úrvinnslu. Rauðar örvar benda á þá litninga sem hafa marktækt færri viðbætur í ofursvörum miðað við öll viðmið.

(einnig þekkt sem *circular binary segmentation*) *bio-conductor* forritapakki [21]. Stillingarnar sem notaðar voru: minnsti fjöldi samliggjandi þreifara sem þurfti til þess að vera samfellt svæði voru tveir, θ -gildið var 0,01 og fjöldi umráðana (*permutations*) við útreikning á P -gildi var 10.000.

Eftir að búið var að skilgreina svæði með sömu hegðun (framkvæma "segmentation") voru þau skilgreind sem úrfelling, viðbót eða enginn munur (-1,1 eða 0) milli B-eitilfrumna og kornfrumna í hverjum einstaklingi.

Niðurstöður

DNA var einangrað úr B-eitilfrumum og kornfrumum úr 7 einstaklingum með ofursvarandi B-eitilfrumum, 6 skyldum einstaklingum og 8 óskyldum sem samanburðarsýni. Við úrvinnslu á gögnum eftir þáttapörun á flögum var kynlitningum sleppt. Gögnunum sem fengust út úr þáttapörun á flögurnar var hlaðið inn í Wavi-forrit á alnetinu. Í því voru gögnin normaliseruð og skoðuð á \log_2 skala. Myndir 2 og 3 sýna hvernig úrfellingar/viðbætur (ljósblátt/dökkblátt) á erfðaeftisbútum reyndist vera í B-eitilfrumum miðað við kornfrumur úr hverjum einstaklingi. Hæð hverrar súlu táknar fjölda einstaklinga með úrfellingu/viðbót á hverju svæði. Lægstu súlurnar eru einn einstaklingur og svo lengist súlan um jafn mikla hæð við næsta einstakling með úrfellingu/viðbót á sama svæði og svo koll af kolli.

Hjá viðmiðunarhópnum sést að margir hafa úrfellingar í B-eitilfrumum á ákveðnum svæðum á litningum 2, 14 og 22. Þetta eru svæði sem innihalda genabúta fyrir breytilegu svæði ónæmisglóbúlína. Þar fyrir utan eru áberandi úrfellingar og viðbætur á við og dreif um erfðamengið sem virðast tilviljanakenndar.

Við samanburð á mynd 2 og 3 sést strax munur á dreifingu fjöldabreytinga hjá ofursvörum og viðmiðum þar sem tilviljunarkenndi breytileikinn er mun minni hjá ofursvörum borið við viðmið. Skyld og óskyld viðmið reyndust hafa það líkar niðurstöður að ákveðið var að sýna hér eingöngu niðurstöður hjá óskyldum viðmiðum.

Í B-eitilfrumum úr ofursvörum sáust úrfellingar á ónæmisglóbúlíngenasvæðunum eins og hjá viðmiðum. Gert var T-próf milli ofursvara og allra viðmiða til þess að bera saman bæði mun á fjölda viðbóta innan hvers litnings og fjölda úrfellinga innan litninga. Marktækt færri viðbætur á erfðaeftis reyndust vera á 8 litningum þegar bornir voru saman ofursvarar og öll viðmið (miðað við $p=0,05$). Örvar á mynd 3 sýna hvaða litningar hafa marktækt færri viðbætur miðað við viðmið. Litningarnir eru nr. 7 ($p=0,04$), nr. 12 ($p=0,02$), nr. 14 ($p=0,03$), nr. 15 ($p=0,03$), nr. 17 ($p=0,04$), nr. 19 ($p=0,04$), nr. 20 ($p=0,03$) og nr. 22 ($p=0,04$). Ekki reyndist marktækur munur á fjölda úrfellinga í erfðaeftisnu milli ofursvara og viðmiða ($p=0,17$).

Umræða

Í þessu verkefni voru kannaðar áunnar erfðamengisbreytingar í B-eitilfrumum úr blóði einstaklinga með ofursvarandi B-eitilfrumum úr fjórum íslenskum fjölskyldum með ættlaga MG. Í öllum fjórum fjölskyldunum hafa bæði

greinst tilfelli mergæxla og IgM-MGUS og í tveimur þeirra WM.

Samanburðargreining á örflögu sýndi tap á litningasvæðum bæði þungu og léttu keðju ónæmisglóbúlína hjá báðum hópum. Auk þess komu fram tilviljanakenndar breytingar á dreif um erfðamengið. Þessi almenni breytileika var minni hjá ofursvörum miðað við viðmið. Marktækt minna var um viðbætur á 8 litningum hjá ofursvörum samanborið við viðmið.

Tap á litningasvæðum fyrir bæði þungu og léttu keðju ónæmisglóbúlína sást hjá öllum hópum í B-eitilfrumum. Það er eins og við er að búast því þarna á umröðun sér stað og eingöngu einstaka genabútar eru tjáðir, ekki hinir. Þetta gerist eingöngu í B-eitilfrumum en ekki í öðrum frumum líkamans [6]. Með þessu sást að þetta voru sannarlega B-eitilfrumur sem unnið var með. En þessar B-eitilfrumur voru einangraðar beint úr blóði þátttakenda og gátu því verið á öllum stigum þroskunar frá því þær koma úr merg. Munur milli hópa tók einungis til dreifðra breytinga á öðrum litningasvæðum. Allar B-eitilfrumur sem einangraðar eru úr blóði hafa þegar gengið í gegnum alla þroskun í merg en bara hluti hefur gengið í gegnum sækniþroskun og flokkaskipti. Sá breytileiki sem greinist með samanburðargreiningu er því að öllum líkindum tengdur erfðaeftisbreytingum vegna sækniþroskunar og flokkaskipta. Viðgerðarferlið í kjölfar aðskilnaðar tvíþátta DNA getur einnig verið að brenglast [22]. Minni almennur breytileiki hjá ofursvörum getur mögulega verið tilkomin vegna þess að B-eitilfrumur ofursvara taki í minni mæli en eðlilegt er út þroska í kímstöð og hafi því minni tíma til SHM. Þannig verði þær mótefnaseytandi plasmafrumur eða minnisfrumur án þess að hringsóla lengi innan kímstöðvar.

Með auknum aldri verður breytileiki B-eitilfrumna minni og svar þeirra einhæfara vegna færri stofna (*oligoclonal*). Þrátt fyrir að B-eitilfrumur í eldra fólki hafi minni breytileika er áfram sama hlutfall B-eitilfruma í blóði. Þetta útskýrist með því að þær endurnýjast hægar en lifa þess í stað lengur, að auki er talið að þessir fækkuðu stofnar gefi af sér aukinn fjölda plasmafrumna [23,24]. Í öldrunum er minna um sértækni ónæmisglóbúlína, sækniþroskun þeirra og flokkaskipti yfir í IgG eða IgA [25]. Samkvæmt þessu getur verið að B-eitilfrumur ofursvara sýni öldrunareinkenni óháð lífaldri viðkomandi einstaklings. Þessi öldrunareinkenni komi fram sem langlífari, mótefnaseytandi plasmafrumur en alla jafna er eðlilegt í heilbrigðum einstaklingum [26]. Þegar haft er í huga að tíðni MG eykst almennt með auknum aldri má hugsa sér að ættlög tilhneiging til MG tengist tilbrigði í ónæmissvari sem líkist því sem gerist við öldrun.

Þakkir

Verklegur hluti þessa rannsóknarverkefnis fór fram í Læknagarði Háskóla Íslands. Verkefnið var styrkt af RANNÍS.

Eftirtaldir einstaklingar eiga þakkir skildar: Samstarfsfólk í Læknagarði fyrir leiðbeiningar og aðstoð við vinnslu

sýnanna, starfsfólk NimbleGen fyrir aðstoð við val og vinnslu á örflögum, Hlynur Sigurgíslason og Guðrún Birna Jónsdóttir fyrir aðstoð við úrvinnslu CGH gagna, Gunnar Stefánsson og Sigrún Helga Lund hjá Tölfræðimiðstöð HÍ fyrir aðstoð við tölfræðiúrvinnslu og síðast en ekki síst blóðgjafarnir sem gerðu þetta verkefni að veruleika.

Heimildir

1. Carter NP. Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nature Genet* 2007; 39: 16-21.
2. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20: 207-11.
3. Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet* 2004; 66: 488-95.
4. Smetana J, Frohlich J, Vranova V, Mikulasova A, Kuglik P, Hajek R. Oligonucleotide-based array CGH as a diagnostic tool in multiple myeloma patients. *Klin Onkol* 2011; 24 Suppl: 43-8.
5. Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway's immunobiology*. 7th ed. New York: Garland Science; 2008.
6. Dudley DD, Chaudhuri J, Bassing CH, Alt FW. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv Immunol* 2005; 86: 43-112.
7. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 230-42.
8. McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L. Molecular programming of B cell memory. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 24-34.
9. Vangsted A, Klausen TW, Vogel U. Genetic variations in multiple myeloma I: effect on risk of multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2012; 88: 8-30.
10. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res* 2004; 64: 1546-58.
11. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 2010; 24: 1121-7.
12. McMaster ML, Caporaso N. Waldenstrom macroglobulinaemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance: emerging understanding of a potential precursor condition. *Br J Haematol* 2007; 139: 663-71.
13. Ogmundsdóttir HM, Haraldsdóttir V, Johannesson GM, et al. Familiality of benign and malignant paraproteinemias. A population-based cancer-registry study of multiple myeloma families. *Haematologica* 2005; 90: 66-71.
14. Landgren O, Kristinsson SY, Goldin LR, et al. Risk of plasma cell and lymphoproliferative disorders among 14621 first-degree relatives of 4458 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance in Sweden. *Blood* 2009; 114: 791-5.
15. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005; 18: 689-707.
16. Steingrimsdóttir H, Einarsdóttir HK, Haraldsdóttir V, Ogmundsdóttir HM. Familial monoclonal gammopathy: hyper-responsive B cells in unaffected family members. *Eur J Haematol* 2011; 86: 396-404.
17. Ogmundsdóttir HM, Johannesson GM, Sveinsdóttir S, Einarsdóttir S, Hegeman A, Jensson O. Familial macroglobulinaemia: hyperactive B-cells but normal natural killer function. *Scand J Immunol* 1994; 40: 195-200.
18. Ogmundsdóttir HM, Sveinsdóttir S, Sigfusson A, Skaftadóttir I, Jonasson JG, Agnarsson BA. Enhanced B cell survival in familial macroglobulinaemia is associated with increased expression of Bcl-2. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 252-60.
19. Carro A, Rico D, Rueda OM, Diaz-Uriarte R, Pisano DG. waviCGH: a web application for the analysis and visualization of genomic copy number alterations. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: W182-7.
20. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. In: Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2011.
21. Venkatraman ES, Olshen AB. A faster circular binary segmentation algorithm for the analysis of array CGH data. *Bioinformatics* 2007; 23: 657-63.
22. Roddam PL, Allan JM, Dring AM, Worrillow LJ, Davies FE, Morgan GJ. Non-homologous end-joining gene profiling reveals distinct expression patterns associated with lymphoma and multiple myeloma. *Br J Haematol* 2010; 149: 258-62.
23. Bulati M, Buffa S, Candore G, et al. B cells and immunosenescence: a focus on IgG+IgD-CD27- (DN) B cells in aged humans. *Ageing Res Rev* 2011; 10: 274-84.
24. Dunn-Walters DK, Ademokun AA. B cell repertoire and ageing. *Curr Opin Immunol* 2010; 22: 514-20.
25. Frasca D, Landin AM, Lechner SC, et al. Aging down-regulates the transcription factor E2A, activation-induced cytidine deaminase, and Ig class switch in human B cells. *J Immunol* 2008; 180: 5283-90.
26. Cancro MP, Hao Y, Scholz JL, et al. B cells and aging: molecules and mechanisms. *Trends Immunol* 2009; 30: 313-8.

NML 2013 Norðurlandaráðstefna lífeindafræðinga árið 2013 verður haldin dagana 12. - 15. júní í Þrándheimi í Noregi

